

(19)



Deutsches
Patent- und Markenamt



(10) **DE 10 2011 101 934 B4** 2017.07.06

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2011 101 934.4**

(22) Anmeldetag: **18.05.2011**

(43) Offenlegungstag: **22.11.2012**

(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **06.07.2017**

(51) Int Cl.: **G01N 21/64 (2006.01)**

Innerhalb von neun Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:

**Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, 24118
Kiel, DE; GEOMAR Helmholtz-Zentrum für
Ozeanforschung Kiel, 24148 Kiel, DE**

(72) Erfinder:

**Friedrichs, Gernot, Prof. Dr., 24808 Jevenstedt,
DE; Wahl, Martin, Prof. Dr., 24107 Kiel, DE;
Fischer, Matthias, 24118 Kiel, DE**

(74) Vertreter:

**Hansen und Heeschen Patentanwälte, 21680
Stade, DE**

(56) Ermittelter Stand der Technik:

siehe Folgeseiten

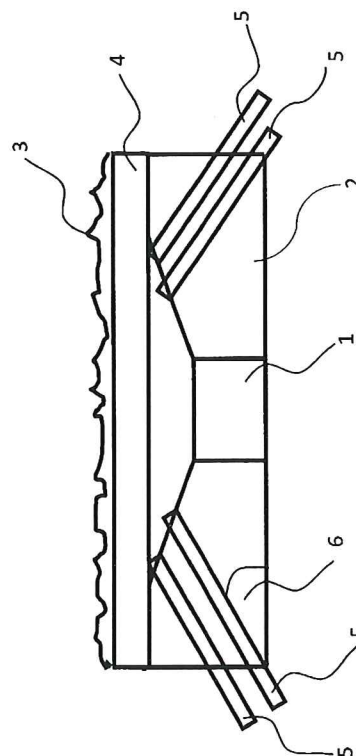
(54) Bezeichnung: **Großflächiger Biofilmsensor**

(57) Hauptanspruch: Optischer Biofilmsensor zur Bestimmung biologischer Eigenschaften eines Biofilms auf einem Siedlungssubstrat (4), mit:

- einem Sensorkopf (2),
- einer im Sensorkopf (2) angeordneten, ein definiertes Emissionsspektrum ausstrahlenden Lichtquelle (1), und
- wenigstens einem Detektor zum Detektieren von vom Biofilm (3) emittiertem Licht,

dadurch gekennzeichnet,

dass eine Mehrzahl lichtleitender Glasfasern (5) unterhalb des Siedlungssubstrats (4) ringförmig um die zentral im Sensorkopf (2) angeordnete Lichtquelle (1) angeordnet ist, wobei die lichtleitenden Glasfasern (5) wenigstens in Bezug auf eine räumliche Achse in einem Anstellwinkel (6) schwenkbar eingerichtet sind.



(19)



Deutsches
Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2011 101 934 B4** 2017.07.06

(56) Ermittelter Stand der Technik:

| | | |
|----|------------------|----|
| DE | 10 2005 021 205 | B4 |
| DE | 10 2005 033 926 | A1 |
| DE | 10 2009 011 381 | A1 |
| DE | 29 704 185 | U1 |
| DE | 36 50 688 | T2 |
| DE | 38 89 757 | T2 |
| DE | 600 32 411 | T2 |
| DE | 699 29 224 | T2 |
| CH | 572 639 | A5 |
| US | 6 899 675 | B2 |
| US | 7 608 841 | B2 |
| US | 2006 / 0 254 343 | A1 |
| US | 2007 / 0 269 837 | A1 |
| WO | 01/ 97 902 | A2 |

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft einen Biofilmsensor zur Bestimmung biologischer Eigenschaften eines Biofilms.

[0002] Biofilme bilden sich in aquatischen Systemen an nahezu jeder Oberfläche und repräsentieren damit einen Teil der mikrobiologischen Gesamtgemeinschaft. Es entwickeln sich dreidimensionale Strukturen aus Bakterienzellen, extrazellulären polymeren Stoffen und Partikeln. Die Besiedlung einer Oberfläche erfolgt nicht regelmäßig, sondern inhomogen.

[0003] Treffen elektromagnetische Wellen von der Wellenlänge einiger Hundert Nanometer auf einen Biofilm, so können diese reflektiert, gestreut und absorbiert werden. Eine möglichst genaue Bestimmung der Besiedlungsdichte wird daher unter anderem dadurch erreicht, dass eine große Oberfläche, möglichst größer als ein Quadratzentimeter, vermessen wird.

[0004] Durch die Absorption von Licht im UV-VIS-Bereich lassen sich verschiedene Fluorophore in biologischen Zellen mit elektromagnetischen Wellen zur intrinsischen Fluoreszenz anregen. Als natürliche Fluorophore können eine Vielzahl von Molekülen verwendet und unterschiedliche Parameter gemessen werden. Zum Beispiel ergibt sich für die Messparameter DNA, RNA bei einer Extinktion von 258 nm als Biomasse-Messsignal eine Emission von 320 nm, für Aminosäuren, die bei 280 nm angeregt werden, als Biomasse-Messsignal eine Emission von 350 nm und bei NADH als Messparameter für Stoffwechselaktivität mit einer Extinktion von 340 nm ein Messsignal bei einer Wellenlänge von 460 nm. Durch Messung der Fluoreszenzintensität von Biofilmen kann somit auf die Biomasse, die Stoffwechselaktivität, die Zellzahl und die prozentuale Besiedlungsfläche geschlossen werden.

[0005] Es sind unterschiedliche optische Detektionsmethoden zur kontinuierlichen Messung von Biofilmen bekannt, die auf spezifischen Wechselwirkungen zwischen Licht und die den Biofilm aufbauenden Molekülen basieren. Als Beispiel für bisher verwendete Systeme seien unter anderem glasfasergekoppelte Streulichtsensoren – die die unspezifische Rückstreuung des emittierten Lichts messen – und glasfasergekoppelte Fluoreszenzsensoren genannt. Ein spezieller Absorptionssensor ist der ATR-Sensor, der nach seinem Funktionsprinzip – Attenuated Total Reflection – so bezeichnet wird. Weitere Sensoren dieser Art basieren auf der Surface Plasmon Resonance; sogenannte SPR-Sensoren.

[0006] Mit ATR- und SPR Sensoren lassen sich sehr empfindlich erste Ansiedlungen von Bakterien messen. Komplexe natürliche Biofilme können mit diesen

Methoden aber nicht quantifiziert werden, da die Eindringtiefe der evaneszenten Wellen in den aufwachsenden Biofilm im Bereich von nur wenigen Hundert Nanometern liegt.

[0007] Weiterhin bekannt wurden in den letzten Jahren drei vergleichbare Biofilmsensoren, die in den US-Patenten 6,718,077 B1 und 7,190,457 B2 sowie in der internationalen Patentanmeldung US 2006/0254343 A1 beschrieben sind. Ein Nachteil der beschriebenen Systeme, die auf Messung der direkten Fluoreszenz mit einer Glasfaser beruhen, ist, dass durch das den Biofilm umgebende Medium hindurch detektiert wird.

[0008] Wie bereits oben beschrieben, können Proteine, die aus Aminosäuren bestehen und in Biofilmen zahlreich enthalten sind, durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. In Proteinen dominiert aufgrund der hohen Absorptionsquerschnitte und Fluoreszenzquantenausbeute in der Regel die Tryptophan-Fluoreszenz. Das Tryptophan weist ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm auf und besitzt einen Fluoreszenzemissionspeak bei 350 nm.

[0009] Die Eigenfluoreszenz solcher Biofilme kann selektiv durch schmalbandige LED-Quellen oder einer anderen Lichtquelle angeregt werden. Dabei ist es wichtig, auf eine möglichst stabile und gleichförmige Anregung des Biofilms zu achten. Temperaturbedingte Intensitätsschwankungen einer LED als Lichtquelle sollten über eine temperaturkompensierte Konstantstromquelle ausgeglichen werden oder über einen Referenzkanal gemessen werden. Zur weiteren Selektion der Anregungswellenlänge können Bandpassfilter eingesetzt werden. Zum Einkoppeln des Anregungslichts und zur Detektion des emittierten Lichts werden heute bevorzugt Glasfasern oder optische Linsensysteme verwendet.

[0010] Ebenfalls Stand der Technik ist es, dass das emittierte Fluoreszenzlicht – bevor es auf den Detektor gelangt – in der Regel durch wellenlängenselektive, optische Bauelemente, wie Bandpassfilter und/oder Monochromatoren geleitet wird. Dadurch werden Streustrahlung und Störfluoreszenz unterdrückt. Im oben genannten Beispiel erlaubt die Kombination zwischen einer schmalbandigen Lichtquelle und optischen Filtern eine spezifische Detektion der Eigenfluoreszenz des Biofilms bei gleichzeitiger Minimierung der Detektion von Hintergrund- und Störstrahlung. Als Detektoren können Sekundärelektronenvervielfacher oder Lawinenfotodioden (APD) verwendet werden. Damit ist es möglich, einzeln eintreffende Photonen der Biofilmfluoreszenz über die Zeit aufzusummieren und so die häufig sehr geringe Fluoreszenzintensität zu messen. Es ergibt sich als auswertbarer Messeffekt innerhalb der einzeln untersuchten Biofilme eine nahezu lineare Korrelation

zwischen Messsignal und Proteinkonzentration beziehungsweise der Bakterienanzahl.

[0011] Alle bisher beschriebenen Systeme nutzen zudem Anregungsquellen mit hohen Energiedichten wie Lasersysteme und Hochdruckdampflampen.

[0012] Die DE 297 04 185 U1 beschreibt eine Vorrichtung zum Erkennen von Karies, Plaque oder bakteriellem Befall an Zähnen, mit einer Einrichtung zum Erzeugen einer Anregungsstrahlung, welche mit Hilfe eines zahnärztlichen Handstücks auf einen zu untersuchenden Zahn zu richten ist, und mit einer Emissions- und Erfassungseinrichtung zum Bestrahlen des zu untersuchenden Zahnes mit der Anregungsstrahlung und zum Erfassen einer an dem bestrahlten Zahn angeregten Fluoreszenzstrahlung, wobei die Emissions- und Erfassungseinrichtung mit dem zahnärztlichen Handstück abnehmbar gekoppelt ist und eine Vielzahl von einzelnen Emissionsfasern, welche den zu untersuchenden Zahn mit der Anregungsstrahlung bestrahlen, und Detektionsfasern, welche die an dem bestrahlten Zahn angeregte Fluoreszenzstrahlung erfassen, umfassen.

[0013] Nachteilig am Stand der Technik ist, dass es nicht gelingt, große Flächen bei gleichbleibender Nachweiseffizienz des Detektionssystems zu vermessen. Großflächige Untersuchungen von Biofilmen sind aber besonders wichtig, da eine Besiedlung in praxi nicht homogen verteilt erfolgt. Ebenfalls nachteilig ist, dass ein direktes Anregen der Fluoreszenz im Biofilm nicht unmittelbar über eine gezielte und gebündelte Einkopplung des Anregungslichts auf den Biofilm erfolgt. Weiterhin nachteilig an bisherigen Systemen ist die häufig kleine Detektionsfläche von nur wenigen Quadratmikrometern, die für makroskopisch gültige Aussagen unbefriedigend sind.

[0014] Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung in Form eines Sensorkopfes zur Messung großflächiger Biofilme mit hoher Sensitivität zu schaffen.

[0015] Erfindungsgemäß wird die Aufgabe gelöst durch einen optischen Biofilmsensor mit den Merkmalen von Anspruch 1.

[0016] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Aufgabe dadurch gelöst, dass die lichtleitenden Glasfasern (5) in einer Mehrzahl von konzentrischen Kreisen angeordnet sind.

[0017] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Aufgabe dadurch gelöst, dass die in Kreisen angeordneten Glasfasern (5) zueinander versetzt angeordnet sind.

[0018] Ebenfalls in einer bevorzugten Ausführungsform wird die Aufgabe dadurch gelöst, dass die licht-

leitenden Glasfasern (5) wenigstens in Bezug auf eine räumliche Achse in einem Anstellwinkel (6) schwenkbar eingerichtet sind.

[0019] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Aufgabe dadurch gelöst, dass das Siedlungssubstrat (4) UV-Licht durchlässig ist.

[0020] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Aufgabe dadurch gelöst, dass der Biofilm (3) von der Lichtquelle (1) rückwärtig bestrahlt wird.

[0021] In einer ebenfalls bevorzugten Ausführungsform wird die Aufgabe dadurch gelöst, dass der Biofilmsensor gekennzeichnet ist durch ein der Lichtquelle (1) und den Glasfasern (5) vorgelagert angeordnetes lichtdurchlässiges Siedlungssubstrat (4) zur Besiedlung mit Mikroorganismen auf der der Lichtquelle (1) und den Glasfasern (5) abgewandten Seite des Substrats (4).

[0022] In einer weiteren Ausführungsform wird die Aufgabe dadurch gelöst, dass die Lichtquelle (1) ausgeführt als LED, oder als Laser-Diode oder als UV-Lampe ist.

[0023] Ebenfalls in einer weiteren Ausführungsform wird die Aufgabe dadurch gelöst, dass der Detektor bzw. der lichtdetektierende Abschnitt eines Detektors eine Lawinenfotodiode (APO) ist.

[0024] Die Erfindung wird im Folgenden anhand von zwei Figuren erläutert. Dabei zeigen:

[0025] Fig. 1 den Biofilmsensorkopf in der Seitenansicht und

[0026] Fig. 2 den Biofilmsensorkopf in der Draufsicht.

[0027] Die Aufgabe wird demnach gelöst, indem eine bevorzugt schmalbandige Lichtquelle (1) mit definiertem Emissionsspektrum mittig im Sensorkopf (2) integriert wird, die von ringförmig, besonders bevorzugt in Reihen versetzten Glasfasern (5), umgeben ist. Damit kann ein möglichst hoher Anteil der Fluoreszenzemission bei gleichzeitig großer Anregungsfläche des Biofilms (3) eingesammelt und mittels der Glasfasern (5) auf einen Detektor geleitet werden. Der Biofilm (3), der auf dem Siedlungssubstrat (4) direkt auf einer bevorzugt UV-transparenten Oberfläche insbesondere aus Quarzglas und/oder einer direkt aufliegenden Einweg-Plastikfolie siedelt, wird dabei rückwärtig mit geringer Lichtstärke gleichmäßig beleuchtet. Durch die erfindungsgemäß ermöglichte Variation des Siedlungssubstrats (4) lassen sich unterschiedliche Oberflächeneigenschaften, wie Oberflächenspannung und Nährstoffangebot, realisieren.

[0028] Durch eine mögliche Änderung des Anstellwinkels (6) der Glasfasern (5) kann zudem der Detektionsbereich der Glasfasern (5) so eingestellt werden, dass im Idealfall nur die Fluoreszenz aus dem Biofilm (3) und nicht die Hintergrundfluoreszenz der umgebenden wässrigen Lösung, detektiert wird. Durch die erfindungsgemäße ringförmige Anordnung der Glasfasern (5) um die schmalbandige Lichtquelle (1) wird gewährleistet, dass möglichst viel Fluoreszenzlicht und wenig Streulicht auf den Detektor geleitet werden.

[0029] Ebenfalls unterstützend hierfür wirkt die bevorzugt rückwärtige Beleuchtung als auch die Anordnung der Fasern, durch die die Anregung und Detektion von Fluorophoren, die sich in der umgebenden Flüssigkeit befinden, minimiert werden. Die rückwärtige Beleuchtung garantiert zudem, dass eine Beeinflussung des Messsignals durch Bewuchs der Lichtquelle selbst vermieden wird. Insbesondere bei kontinuierlichen Messungen über längere Zeiträume findet ungewollte Akkumulation von Zellen auf der Oberfläche der Lichtquelle selbst statt. In diesen Fällen werden die Messwerte verfälscht und lassen sich auch nicht ohne Weiteres korrigieren.

[0030] Durch die Integration des Messsignals über die große Fläche wird eine hohe Empfindlichkeit mit $< 4 \cdot 10^4$ Bakterienzellen pro Quadratzentimeter erreicht, die somit die Messung von Biofilmen in einer sehr frühen Phase der Biofilmbildung, und somit die Anlagerung erster Bakterienzellen, erlaubt. Eine große Besiedlungsfläche auf dem Substrat (4) ist bei Untersuchungen von Biofilmen (3) besonders wichtig, da die Besiedlung nicht homogen verteilt erfolgt und bei der Besiedlung Randeffekte auftreten können, die bei kleinflächiger Auswertung das Messsignal verfälschen können.

[0031] Ein weiterer Vorteil des hier vorgestellten Sensorkopfes gegenüber herkömmlichen ATR- und SPR-Sensoren ist, dass das Anregungslicht mehrere Millimeter in den Biofilm (3) eindringt und es so möglich ist, vielschichtige Biofilme (3) vermessen zu können.

[0032] Zwecks Erweiterung der Messanordnung kann durch konstruktive Verkleinerung der einzelnen Baugruppen des Sensors [LED, Filter, Detektor] bei gleichzeitiger Erhaltung einer großen Siedlungsfläche das Gesamtsensorsystem für unterschiedliche Messaufgaben/Zielstellungen angepasst werden.

[0033] Statt der Glasfasern (5), die das Fluoreszenzlicht auf einen Detektor leiten, können bevorzugt APD-Elemente als Detektoren für eine direkte Messsignalaufnahme eingesetzt werden. Als Anregungslichtquellen sind, je nach Einsatz- und Messaufgabe, kompakte Lichtemitter-, Laserdioden oder Glasfaser-gekoppelte UV-Lampen mit den gewünschten/

erforderlichen Emissionsbereichen in Kombination mit den entsprechenden Spektralfiltern verwendbar. Durch die besonders bevorzugte Verwendung von Mikrofiltern können auch mehrere Lichtquellen in den Sensorkopf (2) integriert werden. Dieses ermöglicht eine gleichzeitige Mehrparameteranalyse, beispielsweise von Biomasse, Stoffwechselaktivität und Zellenergie. Bei gleichzeitiger Mittelung über eine große Fläche können diese Werte direkt miteinander verglichen werden.

[0034] Wird auf eine Anregung des Biofilms (3) verzichtet, können in einer nächsten Erweiterung des Sensors biolumineszente Biofilme [z. B. *Vibrio Fischei*] auf einer großen Oberfläche untersucht werden.

[0035] Durch einen minimalen Einsatz von Baugruppen, einem platzsparenden Aufbau, sowie der geringen Wärmeentwicklung und dem geringem Energieverbrauch kann der Sensorkopf (2) ebenfalls in medizinische Geräte integriert werden.

[0036] Eine weitere Verwendungsmöglichkeit ergibt sich durch den Einsatz als Sensor zur Regelung und Steuerung von Prozessen, bei der eine Biofilmentwicklung erwünscht oder unerwünscht ist.

[0037] Auch kann die Substratoberfläche mit Aptameren [DNA- oder RNA-Fragmente] als bakterienspezifische Bindestellen beschichtet werden. Bei einem so konfigurierten Biosensor kann die Anhaftung von Bakterien an die Aptamere durch eine veränderte Fluoreszenzintensität detektiert werden.

[0038] Der so dargestellte kompakte Sensorkopf (2) ermöglicht eine kontinuierliche Messung der Biofilmdynamik auf einer großen UV-transparenten Oberfläche von mehr als einem Quadratzentimeter – sowohl im Labor als auch unter Feldbedingungen.

Bezugszeichenliste

- 1 Lichtquelle
- 2 Sensorkopf
- 3 Biofilm
- 4 Siedlungssubstrat
- 5 Glasfaser
- 6 Anstellwinkel

Patentansprüche

1. Optischer Biofilmsensor zur Bestimmung biologischer Eigenschaften eines Biofilms auf einem Siedlungssubstrat (4), mit:
 - einem Sensorkopf (2),
 - einer im Sensorkopf (2) angeordneten, ein definiertes Emissionsspektrum ausstrahlenden Lichtquelle (1), und

– wenigstens einem Detektor zum Detektieren von vom Biofilm (3) emittiertem Licht,
dadurch gekennzeichnet,
 dass eine Mehrzahl lichtleitender Glasfasern (5) unterhalb des Siedlungssubstrats (4) ringförmig um die zentral im Sensorkopf (2) angeordnete Lichtquelle (1) angeordnet ist, wobei die lichtleitenden Glasfasern (5) wenigstens in Bezug auf eine räumliche Achse in einem Anstellwinkel (6) schwenkbar eingerichtet sind.

2. Biofilmsensor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die lichtleitenden Glasfasern (5) in konzentrischen Kreisen angeordnet sind.

3. Biofilmsensor nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die in Kreisen angeordneten Glasfasern (5) zueinander versetzt angeordnet sind.

4. Biofilmsensor nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Siedlungssubstrat (4) UV-Licht durchlässig ist.

5. Biofilmsensor nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Biofilm (3) von der Lichtquelle (1) rückwärtig bestrahlt wird.

6. Biofilmsensor nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch ein der Lichtquelle (1) und den Glasfasern (5) vorgelagert angeordnetes lichtdurchlässiges Siedlungssubstrat (4) zur Besiedlung mit Mikroorganismen auf der der Lichtquelle (1) und den Glasfasern (5) abgewandten Seite des Substrats (4).

7. Biofilmsensor nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Lichtquelle (1) eine LED, eine Laser-Diode oder eine UV-Lampe ist.

8. Biofilmsensor nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Detektor oder der lichtdetektierende Abschnitt eines Detektors eine Lawinenfotodiode (APD) ist.

Es folgen 2 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

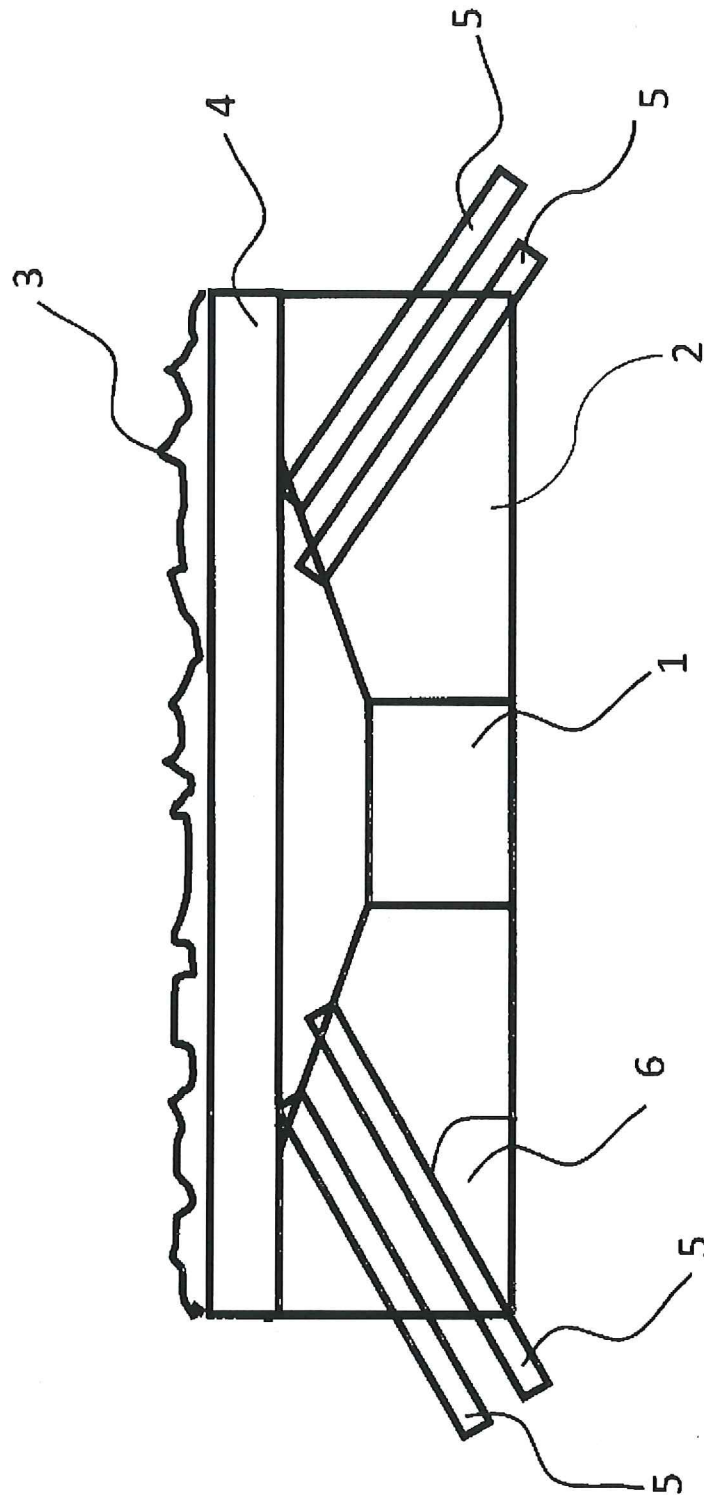


Fig.: 1

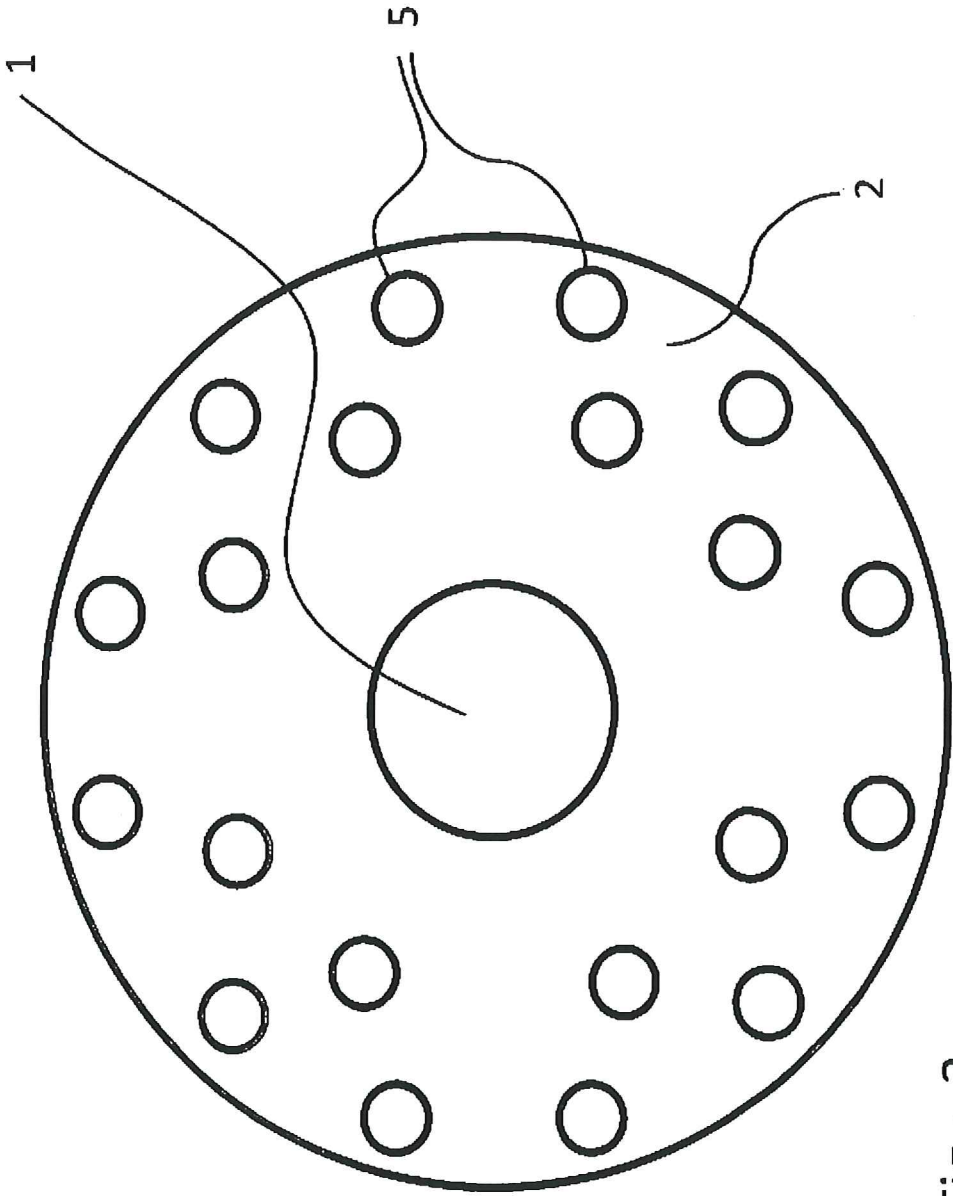


Fig.: 2